

令和4年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

分担研究報告書

Mycobacterium phlei、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*の不活化試験から示された
高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性

研究分担者	森 康則	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	永井 佑樹	三重県保健環境研究所	微生物研究課
研究協力者	豊田真由美	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	亀山 有貴	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	谷本 健吾	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	佐藤 大輝	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	山本 哲司	花王株式会社	ハウスホールド研究所
研究協力者	細川 賢人	花王株式会社	ハウスホールド研究所
研究協力者	田中 孝典	花王株式会社	ハウスホールド研究所

研究要旨

高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒は、連用により *Mycobacterium phlei* 等の雑菌が繁殖してしまうことが問題となる。この増殖が生じる理由は未だ不明で、その解消を意図して、試験管内試験により消毒効果を詳細に検討した。*M. phlei* は、細胞壁に脂質を多く含む非結核性抗酸菌の一種であり、消毒への抵抗性が特に強いことが懸念される。比較対象に *Bacillus subtilis* と *Escherichia coli*、検液に pH 9.6 の温泉水を使用した。*E. coli* はモノクロラミンでも遊離塩素でも、速やかに不活化された。*B. subtilis* の 1-Log 不活化に必要な CT 値は、遊離塩素消毒でおよそ 2,000 mg/L・min、モノクロラミン消毒でおよそ 250 mg/L・min を要し、*M. phlei* の不活化と同程度であった。本実験条件では *B. subtilis* の芽胞形成が考慮されていないが、グラム陽性の強い方の細菌であり、*M. phlei* は消毒に強い抵抗性を有することが改めて示された。pH9.6 では遊離塩素消毒の効果がとても弱く、モノクロラミン消毒の有用性を改めて確認した。雑菌の繁殖に対しては、消毒だけで解決しようとせず、連用しないこと、洗浄を行うことが重要と考えられた。

A. 研究目的

温泉利用施設では、その経済性や取扱の簡便さ等の理由から、次亜塩素酸ナトリウムの添加による遊離塩素消毒が広く使用されてきた。しかし、遊離塩素消毒が阻害される高アルカリ温泉等の一部の温泉では、必ずしも遊離塩素が最適ではなく、モノクロラミン消毒が選択肢のひとつとして通知に追加された¹⁻³⁾。非火山性地域の大深度掘削による温泉開発が全国的に増加しているが⁴⁾、これらは高アルカリ温泉水が多く、これらに対する効果的な消毒方法の要求が高まるとの予想もある。

本研究班では、高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証⁵⁻⁷⁾や、試験管内試験⁸⁾など、高アルカリ温泉に対するモノクロラミンの消毒効果や実用性の検証を続けてきた。その結果、モノクロラミン消毒の連用により生じる *Mycobacterium phlei*^{9, 10)}が、試験内では遊離塩素消毒よりも、むしろモノクロラミンにより消毒されやすいことが示されてもいる⁸⁾。

M. phlei は、非結核性抗酸菌 (Non-tuberculous Mycobacteria NTM) の一種で、芽胞を作らない細菌ではあるが細胞壁に脂質を多く含むため、消毒への抵抗性が高いことが問題となる¹¹⁾。実地試験では従属栄養細菌数の増加として *M. phlei* が検出されるのに対して、試験管内試験ではモノクロラミンにより *M. phlei* は消毒されやすく、挙動が異なって見えるのが説明しづらい状況である。考えられる理由として、浮遊状態の *M. phlei* と、バイオフィーム形成時の *M. phlei* の消毒耐性の違いに起因する可能性が示唆されている⁸⁾。

これらに対応するには、モノクロラミン

消毒下においても、こまめな浴槽清掃や配管洗浄を行い、バイオフィームの防止や除去が重要とされる^{8, 12)}。

M. phlei の消毒抵抗性をより詳細に、客観的に評価するには、他の細菌の消毒と比較する方法が考えられる。当該研究では弱い方になるグラム陰性菌の大腸菌と、強い方になるグラム陽性菌の枯草菌を比較対象とした。温泉施設の協力を得て、実際に入浴に使用される pH9.6 の高アルカリの温泉水での消毒試験を行った。

B. 研究方法

先の *M. phlei* の不活化試験^{8, 13)}の方法に準拠して行った。一部繰り返しになるが、以下に概略を記す。

検液として、pH9.6、電気伝導度 EC = 39 mS/m のアルカリ泉を使用した。このアルカリ泉は、モノクロラミン消毒実地試験⁶⁾および *M. phlei* の試験管内試験⁸⁾で用いた温泉水と同一である。検液は試験前に 121°C 15 分間のオートクレーブ滅菌処理を行った。モノクロラミンの消毒液は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ケイ・アイ化成、ケイミックス SP) と硫酸アンモニウム溶液 (同社、レジサイド) を混合して用時調製した。

菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC25922) と枯草菌 (*Bacillus subtilis* NBRC3134) を用いた。濁度により濃度調整した菌原液を、滅菌カップに用意した検液 150 mL に 10⁵~10⁶CFU/mL 程度の終濃度で添加した。滅菌カップにモノクロラミンと遊離塩素を、それぞれ低濃度 (約 5ppm)、中濃度 (約 10ppm)、高濃度 (約 20ppm) の 3 段階の濃度となるように添加した。

消毒時間が 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の時点でカップからサンプリングして、菌数と消毒濃度を測定した。培養用検液を適量のチオ硫酸ナトリウム (関東化学) にて中和した後、適宜希釈してから標準寒天培地 (栄研化学) に混釈し、24 時間 37°C で培養した。

モノクロラミン濃度はポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計 (HACH DR300 Pocket Colorimeter) によるインドフェノール法、遊離塩素濃度はポケット残留塩素計 (HACH Pocket Colorimeter II) による DPD 法で測定した。消毒剤の濃度 (C) と、接触時間 (T) の積として CT 値 (Concentration × Time value)¹⁴⁾ を算出した。なお、先行研究^{15,16)} と異なり、本研究では消毒剤濃度を細かく実測して、その実測値から CT 値を算出している。消毒前後の菌数から消毒された菌の割合 (不活化割合、生残率) を求めた。

C. 研究結果および考察

検液中のモノクロラミンおよび遊離塩素の濃度変化を図 1 に示す。モノクロラミン、遊離塩素とも、菌の添加から実験終了に相当する 120 分後まで、少なくとも 8 割前後の濃度を維持しており、消毒に問題はなかった。温泉水には、消毒を妨げる多様な化学成分が含まれていることがあるが、そのような妨害はなかった。

本消毒試験による各細菌の不活化割合と CT 値の相関プロットを、図 2 と図 3 にそれぞれ示す。*M. phlei* と *B. subtilis* の不活化は同程度であった。1-Log 不活化には、モノクロラミンが CT 値およそ 250 mg/L・min に対し、遊離塩素は CT 値およそ 2,000

mg/L・min であった。本実験の範囲では、遊離塩素消毒で 1-Log 程度しか不活化されず、2-Log 以上の不活化に必要な CT 値は不明であった。一方、モノクロラミンによる 3-Log 不活化は CT 値およそ 750 mg/L・min と測定できており、遊離塩素よりも消毒効果が高かった。すなわち、高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の有用性を改めて確認した。*M. phlei* や *B. subtilis* に対しモノクロラミンは遊離塩素のおよそ 8 倍程度の消毒効果を有するものと推測された。

M. phlei の消毒耐性の強さはこれまでも示唆されていたものの、比較的強い方のグラム陽性菌の *B. subtilis* に匹敵する耐性を有することが明らかになった。本実験の範囲では芽胞形成の有無を確認しておらず、芽胞との比較検討が今後の課題となる。*M. phlei* の消毒耐性は、脂質に富んだ細胞壁に起因するものと推測される。高アルカリ温泉水における遊離塩素消毒下においては、浴槽水の清掃や高濃度洗浄等を行わないと、浴槽水中の *M. phlei* を制御することは困難と思われる。

なお、弱い方のグラム陰性菌の *E. coli* は、高アルカリ温泉水の遊離塩素消毒であっても、それなりに消毒されることが判明した。*E. coli* は、実験最初のサンプリングである 15 分の時点ですでにコロニーをカウントできず、検出限界未満となった。すなわち、消毒剤濃度の最小が 5 mg/L、消毒時間の最短が 15 分により、CT 値 75 mg/L・min の時点で 5 ないし 6-Log 以上に不活化された (図 4)。

しかし、消毒耐性の高い *M. phlei* や *B. subtilis* は、この高アルカリ温泉水の条件で

は CT 値およそ 2,000 mg/L・min で 1-Log 程度しか不活化できないので、仮に 0.1 mg/L や 0.5 mg/L の遊離塩素消毒を行う場合は、20,000 分 (= 333 時間 = 約 14 日間) あるいは 4,000 分 (= 67 時間 = 約 3 日間) でようやく 1-Log の消毒と可能と計算される。消毒に要する時間が長すぎて、その間に菌が減少するよりも増加してしまうかもしれない。すなわち、pH9.6 の遊離塩素消毒では、これらの菌の制御は実用上困難と考えられた。同様の条件で従属栄養細菌数の増加が認められていないのは、単に試験をする機会がなかったのか、消毒により静菌の状態にでもあったのか、あるいは、浴槽水中に浮遊している菌の測定では状況を捉えることができているだけで、配管やろ過器でバイオフィーム形成が進む状況にあるのかもしれない。

これが 3 mg/L のモノクロラミン消毒であれば、3-Log の消毒に要する時間は 250 分 (= 4.2 時間 = 約 0.2 日間) と実用的な範囲と思われた。それでもモノクロラミン消毒を連用している場合は *M. phlei* が多く検出されることがあり、増殖の場や消毒を回避する仕掛けになお一層の興味を持たれる結果であった。

D. 結論

pH9.6 の高アルカリ温泉水を用いて、遊離塩素とモノクロラミンの消毒下における *M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* への消毒効果を比較した。*M. phlei* と *B. subtilis* の消毒耐性は、ほぼ同程度であった。1-Log 不活化には、モノクロラミンの CT 値がおよそ 250 mg/L・min に対し、遊離塩素は 2,000 mg/L・min であった。pH9.6 の高アルカリ温泉水

では、モノクロラミンの方が遊離塩素よりも消毒効果が高かった。

E. 参考文献

1. 泉山信司, 長岡宏美 他: 高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用、厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」(研究代表者 前川純子) より, 平成 28~30 年度総合研究報告書.
2. 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について, 令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 (令和 2 年 12 月 10 日生食発 1210 第 1 号一部改正).
3. 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル, 令和元年 12 月 17 日薬生衛発 1217 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局 生活衛生課長通知.
4. 森 康則, 井上源喜: 日本の温泉の利用状況と経年変化—行政科学的アプローチを中心として, 2021, 地球化学, **55**, 43-56.
5. 柳本恵太, 泉山信司, 森 康則, 長岡宏美 他: 高 pH 温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子) より, 令和元~3 年度 総合研究報告書.
6. 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛

- 治, 田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司: 次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—, 2019, 温泉科学, **69**, 90-102.
7. 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司, 山梨県のアルカリ性 (pH10 程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 日本防菌防黴学会誌, 2021, **49**, 261-267.
 8. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, **72**, 26-37.
 9. 松田宗大, 枝川亜希子, 泉山信司, 小倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 藤井 明, 循環式浴槽から分離された *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果, 2019, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集, p232.
 10. 渡邊貴明, 松田宗大, 小倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 枝川亜希子, 泉山信司, 藤井 明: 循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について, 2018, 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会要旨集, p262.
 11. Oriani, AS., Sierra, F., Baldini, MD., Effect of chlorine an *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and biofilm state, 2018, Int. J. Mycobacteriol., **7**, 122-127.
 12. 森 康則, 泉山信司, 柳本恵太, 長岡宏美 他: モノクロラミン消毒下のバイオフィルムを対策する省力化洗浄方法の開発, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子) より, 令和元~3 年度 総合研究報告書.
 13. 森 康則, 泉山信司, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 枝川亜希子, 藤井 明: モノクロラミンと遊離塩素による *Mycobacterium phlei* の試験管内不活化試験, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子) より, 令和 3 年度 分担研究報告書.
 14. Hermanowicz, S.W., 微生物起因の水質: 規制, 科学, 工学, 1999, 水道協会雑誌, **68**(7), 53-63.
 15. Dantec C.L., Duguet J.P., Montiel A., Dumonutier N., Dubrou S., Vincent V., Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System, 2002, Appl. Environ. Microbiol., **68**, 1025-1032.
 16. Chen Yu Qiao, Chen Chao, Zhang Xiao Jian, Zheng Qi, Liu Yuan Yuan,

Inactivation of resistant *Mycobacteria mucogenicum* in water: Chlorine resistance and mechanism analysis, 2012, Biomed. Environ. Sci., 25, 230–237.

F. 研究発表

誌上発表

1. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, **72**, 26-37.

2. 森 康則, はじめて学ぶ ぼくたちの温泉科学, 2023, 三重大学出版会.

口頭発表

1. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による不活化, 日本温泉科学会第75回大会, 2022年9月, 大分県.

知的所有権の取得状況

特許申請・実用新案登録、その他
なし

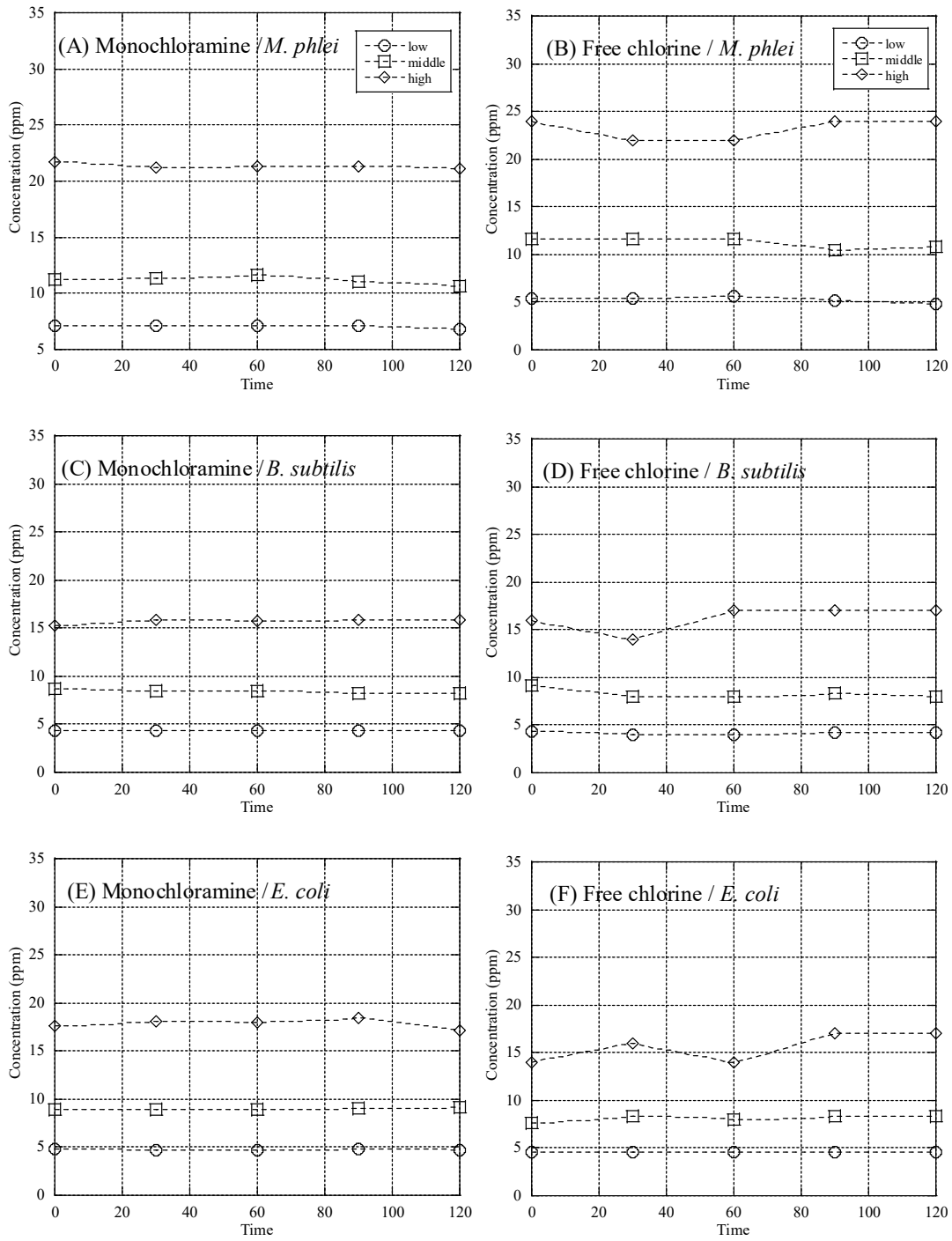


図 1. アルカリ泉中消毒剤濃度の経時変化

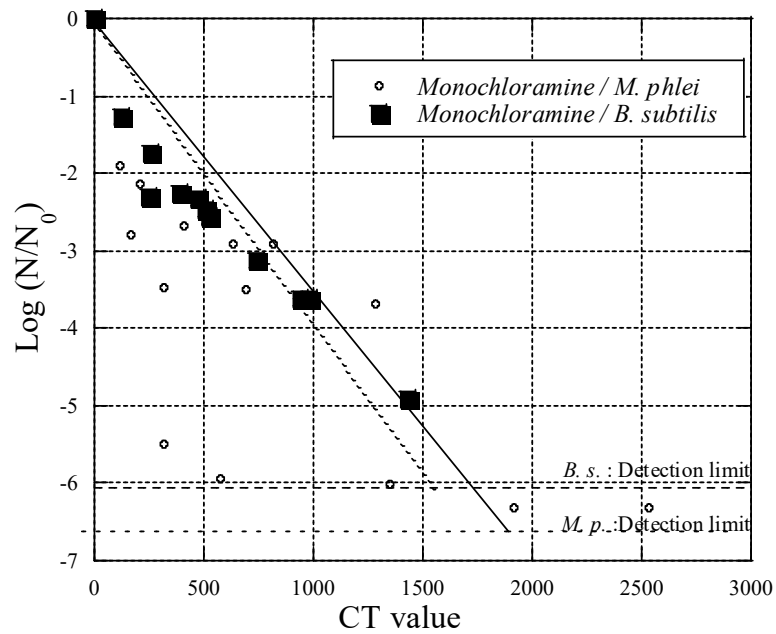


図2. モノクロラミン消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較。実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

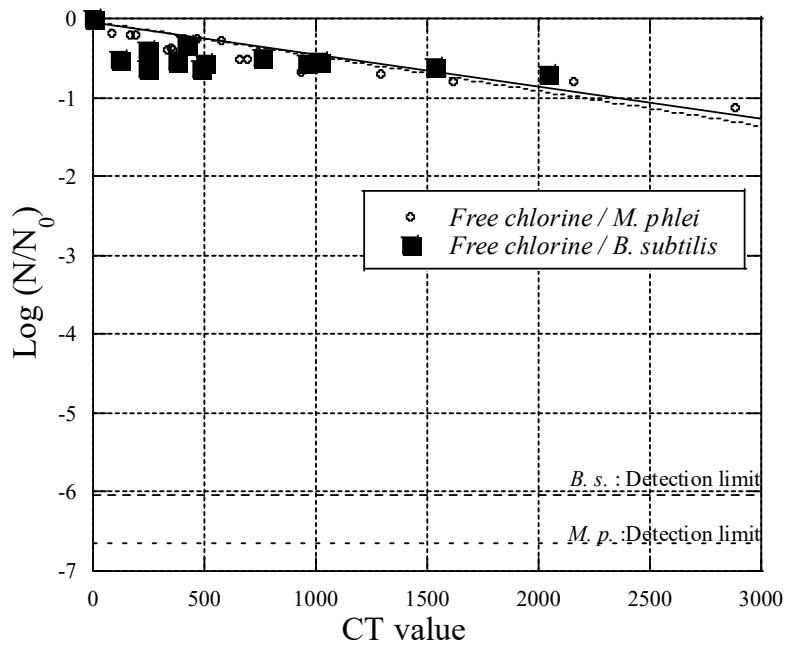


図3. 遊離塩素消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較。実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

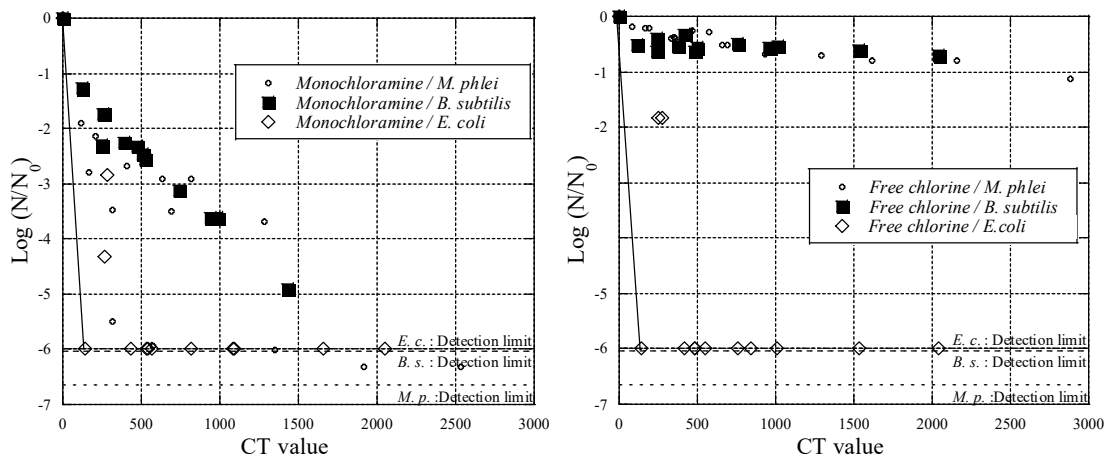


図4. 遊離塩素消毒およびモノクロラミン消毒下の *E. coli* の不活化。本研究の条件下では最も低い CT 値のサンプルを含め、多くがカウントできなかつた（検出限界未満）。原点と最も CT 値が低いプロットとの交点を結んだ線を、不活化曲線として参考表示した。